

**DIE 3 β -ol-STEROID-
DEHYDROGENASE IM NORMALEN
UND ZYSTOS ENTARTETEN OVAR
DES RINDES**

URSULA MEIXNER-VAN DE WITT

1967

Dissertations- und Fotodruck Franz Frank
8 München 13, Zieblandstr. 39, Tel. 597 397

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Klinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr. W. BAIER

DIE 3β - α 1-STEROID-DEHYDROGENASE IM NORMALEN
UND ZYSTÖS ENTARTETEN OVAR DES RINDES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von
Ursula Meixner-van de Witt
aus
Nürnberg

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. A. Herrlich

Referent: Prof. Dr. W. Baier

Tag der Promotion: 27. Februar 1967



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATUR	2
III. MATERIAL UND METHODIK	9
IV. ERGEBNISSE	12
V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	14
VI. ZUSAMMENFASSUNG	17
VII. LITERATURVERZEICHNIS	19

DIE 3β -ol-STEROID-DEHYDROGENASE IM NORMALEN UND ZYSTÖS ENTARTETEN OVAR DES RINDES.

I. EINLEITUNG

In den letzten Jahren hat sowohl die Hormon- als auch die Fermentforschung große Fortschritte erzielt, wobei vor allem die Rolle der Hormon-Fermentbeziehungen und Abhängigkeiten von einander geklärt wurde. So berichten mehrere Autoren vom Vorkommen einer 3β -ol-Steroiddehydrogenase in den Ovarien verschiedener Säugetiere und des Menschen. Es wurde dabei besonders die Aufgabe dieses Enzymes bei der Hormonsynthese untersucht. Seine Bedeutung bei der Steroidbildung im Eierstock wurde geklärt, so daß ein Anhaltspunkt für die Beurteilung der Funktionen steroidbildender Organe gegeben ist.

Über den Funktionszustand des normalen und zystös entarteten Rinderovars im Hinblick auf das Vorkommen des Fermentes 3β -ol-Steroiddehydrogenase sind bisher keine Angaben bekannt. Es erscheint deshalb von Interesse, den 3β -ol-DH-Gehalt sowohl bei normalen als auch zystös entarteten Ovarien des Rindes zu bestimmen, um die Werte miteinander vergleichen zu können.

II. LITERATUR

Die Steroidhormone werden aus niedrigmolekularen Zwischenprodukten des Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettsäurestoffwechsels unter Verbrauch von Energiespendern wie Adenosintriphosphorsäure (ATP) oder Diphosphopyridinnucleotid (DPN) synthetisiert (DORFMAN).

Die Steroidhormonbildung ist eine spezifische Funktion bestimmter Zellformationen der Keimdrüsen, der Nebennierenrinde und der Placenta. Auffallend ist die Ähnlichkeit der Bildung in den verschiedenen endokrinen Organen. Dabei werden die einzelnen Schritte der Synthese wahrscheinlich enzymatisch gesteuert, d.h. die Enzymausrüstung der Zellen sorgt für eine gewisse Geschwindigkeit der Biosynthese (BERSIN). Man nimmt an, daß auch die tropen Hormone der Hypophyse durch Bildung, Aktivierung oder Entblockung spezieller Enzymsysteme regulierend mit eingreifen (DICZFALUSY & LAURITZEN).

Ausgangsstoff für die Biosynthese aller Steroidhormone ist Acetyl-Coenzym A, die aktivierte Essigsäure. Durch Zusammenschluß von drei Molekülen Essigsäure wird Cholesterin gebildet. Nach stufenweisem Abbau seiner Seitenketten entstehen über Zwischenprodukte die verschiedenen Steroidhormone. Zunächst wird Pregnenolon gebildet, das dann enzymatisch in Progesteron umgewandelt wird. Vom Progesteron läuft die Synthese weiter zum 17α -Hydroxyprogesteron (LITTLE & SHAW), einem Proandrogen, aus dem sowohl beim männlichen als auch beim weiblichen Säuger Androgene gebildet werden. Diese wiederum sind Prooestrogene, die über Androstendion in Oestrogene umgewandelt werden (ENGEL, HEARD).

Als Bildungsstätte der Hormone bzw. ihrer Vorstufen wurden die verschiedensten Zellformationen genannt. SHORT stellt auf Grund von Untersuchungen der Steroidfraktionen in Follikelflüssigkeit und in Corpus luteumgewebe von Stuten eine sogenannte "two-cell-type-theory" auf. In der Follikelflüssigkeit hatte er neben vielen anderen Zwischenstufen Progesteron und 17α -Hydroxyprogesteron gefunden, während letzteres im Corpus luteum nur in sehr geringer Menge, C_{18} - und C_{19} -Steroide aber überhaupt nicht nachzuweisen waren. Diese Befunde deuten darauf hin, daß eine Zellart des Follikels, wahrscheinlich die Theka interna, fähig ist, Progesteron über Androgene in Oestrogene umzuwandeln. Die zweite Zellart, die Granulosa-luteinzellen, haben eine verminderte 17α -Hydroxylierungsfähigkeit, so daß in ihnen die C_{21} -Seitenketten nicht abgespalten werden können. Auf diese Weise wird im Corpus luteum überwiegend Progesteron zum Pregnandiol abgebaut und in Harn und Faeces ausgeschieden. In der Follikelwandung gebildetes Progesteron dagegen wird über Androgene zu den

Oestrogenen weiterentwickelt.

Die Identifikation der einzelnen Steroidfraktionen ist außerordentlich schwierig. Aus diesem Grunde versuchte man über das Verteilungsmuster der Lipoide, die mit den Steroiden verwandt sind, Schlüsse auf deren Bildungsorte zu ziehen.

In der Literatur bestehen verschiedene Ansichten über die genauen Bildungsstätten der Sexogene im Eierstock. So hält zum Beispiel ECKSTEIN alle großen Zellelemente des Ovars zur Oestrogensynthese befähigt.

DICZFALUSY & LAURITZEN hingegen glauben, daß die eigentliche Synthese von den Granulosazellen bewerkstelligt wird, während die anderen Zellformationen Vorstufen, Speicherung oder Metabolismus übernehmen.

In den Zwischenzellen der Keimdrüsen, die wahrscheinlich aus den Thekazellen hervorgehen, soll nach BURKL & KELLNER die basale Oestrogenbildung stattfinden.

Als Ort der Progesteronsynthese gelten die Granulosaluteinzellen. Es wird aber auch ohne Gelbkörper im Ovar wirksames Progesteron gebildet.

HILLIARD stellte fest, daß auch Thekaformationen dazu in Frage kommen können.

DEMPSEY & BASSET zeigten mit Hilfe der Ketosteroidreaktionen auf histochemischem Wege bereits 1943, daß positive Reaktionen eindeutig in der Theka interna zu beobachten sind, nicht aber in der Granulosa. Diese Befunde stimmen mit der Beobachtung überein, daß stets Lipoide in der Theka interna enthalten sind, während diese in der Granulosa nur gelegentlich und in kleiner Menge auftreten.

NIEMI, sowie McKAY & ROBINSON konnten nachweisen, daß die im Eierstock vorkommenden Dehydrogenasen ein den Lipoiden sehr ähnliches Verteilungsmuster zeigen. Da nun die Bildung der Steroidhormone mit Hilfe von Enzymreaktionen vor sich geht, wurde wiederholt versucht mittels histochemischer Methoden das Enzymmuster im Ovar zu bestimmen (KÖNIG).

Zwischen Hormonen und Fermenten bestehen sehr enge Beziehungen. So faßt ABDERHALDEN die Hormone als Regulatoren des ganzen enzymatischen Geschehens auf. Sie beeinflussen die Bildung der Enzymketten entweder fördern oder hemmend, sowohl bei der Synthese als auch beim Abbau der Fermente (JENSEN). Andererseits ist eine Hormonbildung ohne katalysierende Fermente undenkbar. Beim Fehlen bestimmter Hormone sinkt auch die Aktivität des jeweils für die Bildung verantwortlichen Enzymes (MEYER & McSHAN, FUHRMANN).

In den Ovarien einzelner Tierarten und des Menschen konnten bisher eine große Anzahl von verschiedenen Fermenten nachgewiesen werden, von denen bisher 22 genau darstellbar sind. Die spezifischen Aufgaben der verschiedenen Enzyme

sind zum großen Teil noch unbekannt. Wichtige Stoffwechselvorgänge werden von den Phosphatasen (saure und alkalische), Glykosidasen, Aminopeptidasen, Lipasen, Cholesterinasen und vor allem von den Dehydrasen gesteuert.

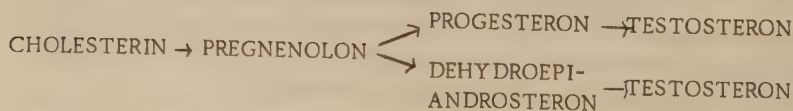
IKONEN konnte 4 Dehydrogenasen im Eierstock nachweisen und zwar eine DPN - (Diphosphopyridinnucleotid) Diaphorase, eine Lactic-Dehydrogenase und eine Succinic-(Bernsteinsäure)-Dehydrogenase, sowie eine 3β -ol-Steroiddehydrogenase. KÖNIG stellte außerdem eine 3α -, 11β -, 17α -, 17β - und 20α -ol-dehydrogenase im Eierstocksgewebe dar. Man nimmt an, daß jede dieser Dehydrogenasen ihren eigenen Schritt im oxydativen Stoffwechsel induziert. Für die 3β -ol-DH konnte die Mitwirkung bei der Steroidsynthese aufgezeigt werden. Im Folgenden soll dieser biochemische Vorgang, soweit er heute bekannt ist, näher beschrieben werden.

Vorkommen der 3β -ol-DH

Alle Gewebe, die Steroidhormone bilden, enthalten eine 3β -ol-DH in den Ribosomen des Zellplasmas. Sie wurde bisher histochemisch im Ovar, in der Nebennierenrinde, in der Placenta und im Hoden nachgewiesen. Verschiedene Untersucher konnten dieses Ferment auch in der Leber darstellen (WATTENBERG, FUHRMANN).

Die 3β -ol-DH gehört chemisch in die Gruppe der Polypeptide. Sie besitzt ein frei abdissoziierbares Coenzym. Da Coenzyme häufig Tochtersubstanzen der Vitamine sind, besteht die Möglichkeit, daß bei der Bildung der 3β -ol-DH die Monodehydroascorbinsäure (HANC) wahrscheinlich zusammen mit den Hypophysenvorderlappenhormonen eine Rolle spielt (SAMUELS & HELMREICH, DEMPSEY).

Die Aufgabe der 3β -ol-DH im Steroidstoffwechsel ist die Umwandlung von C_{19} und C_{21} -Steroiden mit der Δ^5 - 3β -Hydroxygruppe in eine Δ^4 -3-Ketogruppe, ein Charakteristikum der meisten Steroidhormone. Die 3β -ol-DH katalysiert also eine Dehydration. Da sie nur an Δ^5 - d. h. an 3β -ol-Verbindungen angreift, können im Ovar auf zwei Wegen Androgene entstehen (DORFMAN).



Verfahren zum Nachweis der 3β -ol-DH

Im Jahre 1868 wurde zum ersten Male ein Ferment, eine Peroxydase, in den Granulozyten von Eiter gefunden (KLEBS).

Die ersten histochemischen Arbeiten über Enzymnachweise wurden 1932 von CORNER durchgeführt. Er konnte aber lediglich Lipide, die ein ähnliches Verteilungsmuster aufweisen, in der Theka interna, im Corpus luteum und in den interstitiellen Zellen darstellen.

DEMPSEY unternahm 1943 Untersuchungen über den Steroidgehalt von Rattenovarien, McKAY & ROBINSON 1947 von menschlichen Ovarien.

1956 gelang MARCUS & TALALAY die Isolierung und Reinigung von zwei an der Steroidsynthese beteiligten Enzymen, der α - und der β -Hydroxysteroiddehydrogenase. Beide Enzyme sind in der Natur weit verbreitet. Sie wurden u. a. aus zwei Bakterienarten isoliert und kurz danach auch in Gewebsschnitten und Organhomogenaten verschiedener Säugerarten, bei einigen Hefesystemen und bei *Pseudomonas testosteroni* nachgewiesen (MARCUS & TALALAY).

1958 entwickelte WATTENBERG eine spezifische histochemische Technik zum Nachweis der 3β -ol-DH im Gewebe. Er grenzte dieses Enzym in verschiedenen Versuchsreihen gegen andere Diphosphopyridinnucleotid- (DPN)-abhängige Dehydrogenasen, die DPN-Diaphorase und die Malic-Dehydrogenase ab. Beim Kaninchen fand er positive Reaktionen in Schnitten von Nebennierenrinde, Ovar, Hoden und Leber. Im Ovar und im Hoden war das Ferment nur in den interstitiellen Zellen, nicht in der Granulosa reifender Follikel oder in der Theka nachzuweisen. Bei der Ratte zeigten Gelbkörper und die interstitiellen Zellen eine positive Reaktion, beim Menschen nur der Gelbkörper.

Ein Jahr später beobachteten LEVY, DEANE und RUBIN im Rattenovar das Ferment mit dem Substrat Dehydroepiandrosteron und Propylenglykol in den interstitiellen Zellen, den Luteinzellen und den Thekazellen. Auch sie fanden keine Fermentaktivität in der Granulosa reifender Follikel, außer bei bereits einsetzender Atresie.

1961 untersuchte IKONEN im Ovar des Menschen die Lokalisation von vier Dehydrogenasesystemen. Die 3β -ol-DH wurde im wachsenden Sekundärfollikel und Tertiärfollikel in der Theka interna gefunden. Die Reaktion in der Granulosazellschicht war nicht eindeutig. Ein hoher Enzymgehalt wird regelmäßig im Gelbkörpergewebe gefunden, während Stroma und interstitielle Zellen der Ovarien keine Reaktion zeigen.

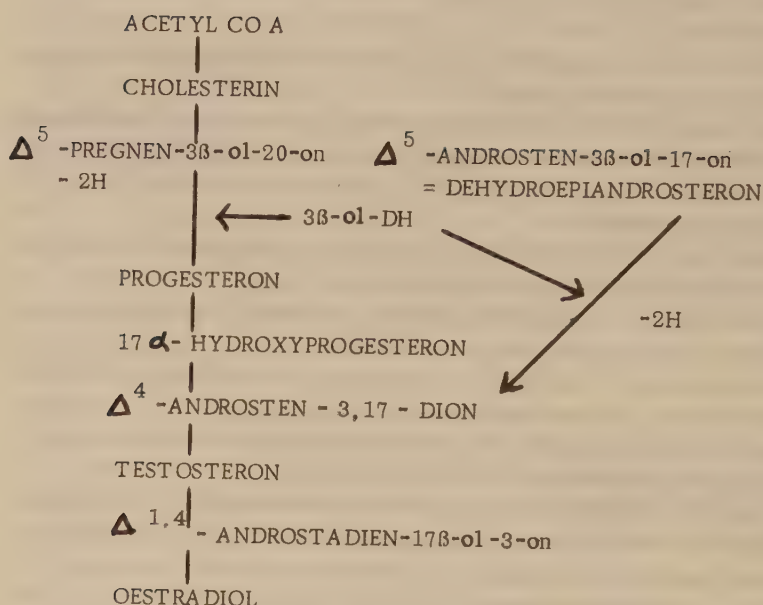


Abb. 1: Angriffspunkte der 3 β -ol-Steroid-Dehydrogenase in der Biosynthese der Steroidhormone

TAYLOR wies 1961 das Vorkommen des Fermentes bei juvenilen, geschlechtsreifen und trächtigen Ratten nach Applikation von gonadotropen Hormonen vor und nach Hypophysektomie nach. Dabei zeigten die Ovarien juveniler Tiere im Alter von 2-4 Wochen in der Theka interna und im interstitiellen Gewebe eine positive Reaktion. Zur Zeit der Geschlechtsreife, etwa im Alter von 6 Wochen, nahm der Fermentgehalt in diesen Zellformationen stark ab. Die Granulosa der Follikel und das Stroma waren sowohl bei juvenilen als auch bei geschlechtsreifen Tieren negativ. Erwachsene Tiere wiesen durch alle Phasen des Zyklus eindeutige Reaktionen in der Theka interna und externa wie auch im Interstitium und in den Corpora lutea auf. Die höchste Reaktionsintensität ist während des Vaskularisationsstadiums im Gelbkörper zu beobachten, also in der Zeit des höchsten Blutprogesteronspiegels.

Mit HCG behandelte Tiere zeigten eine starke Zunahme der Aktivität. Bei hypophysektomierten Tieren war dagegen in keinem Fall die 3 β -ol-Dehydrogenase nachzuweisen. Sie trat jedoch nach anschließender HCG-Gabe in den interstitiellen

len Zellen, in den Corpora lutea und in der Theka wieder auf.

Dies beweist die Abhängigkeit der Enzymaktivität und der Enzymsynthese von der Hypophyse.

Über den Einfluß der gonadotropen Hormone auf die Fermenttätigkeit des Eierstockes bei juvenilen und geschlechtsreifen Ratten und Kaninchen arbeitete 1961 FUHRMANN. Er fand eine spezifische Enzymtätigkeit in den interstitiellen Zellen und in atretischen Follikeln von Rattenovarien bereits vor der Geschlechtsreife. In den Eierstöcken von Kaninchen war die Reaktion im allgemeinen schwächer und undeutlicher ausgeprägt als bei der Ratte. Wahrscheinlich spielten hier artspezifische Unterschiede eine Rolle. Sowohl bei der Ratte als auch beim Kaninchen stieg die 3β -ol-Dehydrogenaseaktivität nach Gonadotropingaben an. An der Lokalisation änderte sich dabei nichts.

FUHRMANN hat das Ferment außerdem noch im Ovar von Mensch und Rind, in der Nebennierenrinde und in der Leber von Ratte und Kaninchen, sowie in Rattenhoden und menschlichen Placenten gefunden (zit. nach JUNG & KÖNIG).

Es induzieren aber nicht nur die tropen Hormone der Hypophyse eine Erhöhung der Enzymaktivität in den steroidbildenden Organen, auch die Steroidhormone selbst wirken allem Anschein nach stimulatorisch auf die Fermentsynthese. BEYLER & Mitarbeiter konnten diesen stimulatorischen Effekt an Rattenhodengewebe nachweisen.

Von JUNG & KÖNIG liegen Untersuchungen vor über das Auftreten der 3β -ol-Steroiddehydrogenase in den Ovarien von Frauen. Sie fanden positive Reaktionen in der Theka interna und in den interstitiellen Zellen von Tertiär- und Graaf'schen Follikeln sowie in den Luteinzellen des Gelbkörpers.

Über das Vorkommen der 3β -ol-DH im Ovar des Rindes liegen außer den Ergebnissen von FUHRMANN leider keine detaillierten Angaben vor. Da dieses Ferment eine zentrale Bedeutung in der Sexagensynthese hat, soll im Folgenden untersucht werden, ob durch den Nachweis des Fermentes in normalen sowie in zystös entarteten Ovarien des Rindes Unterschiede zu erkennen sind.

	WATTENBERG	LEVY	IKONEN	TAYLOR	FUHRMANN	JUNG
OVAR					Mensch Rind	
GRANULOSA	-	-	-	-		
THEKA INT.		Ratte +	Mensch +	Ratte +		Mensch +
INTERSTIT.	+	Ratte +	-	Ratte +		Mensch +
GELBKÖRPER					Ratte + Kan. + Ratte + Kan. + Ratte + Kan. +	
ATRET. FOLL.						
STROMA		Ratte +	-	-		
NNR					Ratte + Kan. + Ratte + Ratte + Kan. +	
HODEN						
LEBER						
PLACENTA					Mensch +	

Abb. II: Übersicht über das Vorkommen der 3β -ol-DH bei verschiedenen Autoren.

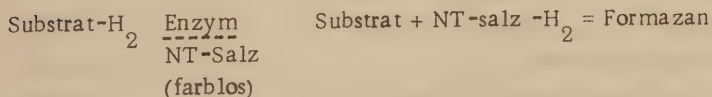
III. MATERIAL UND METHODIK

Zur Untersuchung kamen insgesamt 300 Eierstöcke von geschlechtsreifen Rindern. Die Ovarien wurden am städtischen Schlachthof in München unmittelbar während der Schlachtung entnommen. Die Beurteilung des Zyklusstadiums wurde makroskopisch nach dem Vorliegen von sprungreifen Follikeln bzw. eindeutigen Follikelzysten vorgenommen.

Die lebenswarm gewonnenen Organe wurden sofort nach der Entnahme in pulverisiertes Trockeneis eingelegt. Aus diesem tiefgefrorenen Gewebe wurde spätestens drei Stunden danach ein etwa 1 cm^2 großer und 3-4 mm dicker Block herausgeschnitten, auf dem Objekttisch mit Kohlensäure festgeeeist und im Cryostatmicrotom (System Dittes - Duspiva) bei -20°C in $7\text{ }\mu$ starke Schnitte zerlegt. In 6 aus jedem Block in regelmäßigen Abständen gewonnenen Schnitten wurde dann nach der von WATTENBERG entwickelten, hier jedoch etwas modifizierten Methode, die 3β -ol-Steroid-Dehydrogenase dargestellt.

Der Nachweis der Dehydrogenasen beruht auf deren Fähigkeit Wasserstoff auf geeignete Akzeptoren zu übertragen und diese zu reduzieren. In den eigenen Untersuchungen wurde als Akzeptor ein Neotetrazoliumsalz verwendet, das farblos und gut wasserlöslich ist, durch die Reduktion jedoch in wasserunlösliches, gefärbtes Formazan übergeführt wird (SPANNHOF).

Diese irreversible Formazanbildung durch eine bestimmte Dehydrogenase wird durch Zusatz des für diese Dehydrogenase spezifischen Substrates zur Reaktionslösung erreicht. Die Reduktion geht in mehreren Stufen vor sich. Der notwendige Sauerstoff dazu stammt aus dem spezifischen Substrat. Die Reduktionswirkung anderer Dehydrogenasen liegt ohne deren Substratzugabe unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze.



Zur Bestimmung der Substratspezifität haben WATTENBERG und FUHRMANN verschiedene Steroide getestet. Bei der Demonstration von 3β -ol-Dehydrogenase zeigten nur Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon eine positive Reaktion.

Nach dem Auftauen auf dem Objektträger wurden die Schnitte einer 5-Minutentrocknung bei Zimmertemperatur unterzogen. Bei hoher Luftfeuchtigkeit sollte die Trocknung bis auf 8 Minuten ausgedehnt werden, da sonst die Gewebeschnitte

nicht auf dem Objektträger haften. Danach folgte 10 Minuten Waschen bei $+4^{\circ}\text{C}$ in modifizierter Krebslösung (diese Lösung hat die gleiche Zusammensetzung wie die Reaktionslösung, ist jedoch in $1/3$ Vol destilliertem Wasser gelöst). Nach einer weiteren Waschung in Krebslösung bei Zimmertemperatur 5 Minuten lang folgte 30 Minuten eine Vorfixierung und Fettextraktion in Aceton bei -18°C mit anschließender Trocknung bei -18°C 10 Minuten lang.

Da das Formazan, das durch die Neotetrazoliumreduktion entsteht, eine hohe Lipoidlöslichkeit aufweist, verhindert man durch die Acetonbehandlung das Zusammenfließen von Fettröpfchen in den Schnitten. Man gewinnt dadurch zwar ein etwas schwächeres dafür aber umso übersichtlicheres Enzymverteilungsmuster (WATTENBERG).

Dem Trocknen folgte im Wasserbad die rasche Erwärmung der in die Reaktionslösung eingelegten Schnitte bis auf 38°C und Bebrütung im Wärmeschrank bei $+38^{\circ}\text{C}$ für 30 Minuten.

Nach erneutem Auswaschen der Schnitte in modifizierter Krebslösung 5 Minuten lang wurden die Gewebeschnitte 10 Minuten in 10%igem neutralem Formalin fixiert und nach dem Trocknen mit Glycerin konserviert.

Das optimale Incubationsmedium für den Nachweis der 3β - α 1-Steroid-Dehydrogenase setzt sich aus folgenden Reagentien zusammen:

1.	Dehydroepiandrosteron (10mM in Aceton)	0,5 ml
2.	DPN (1,3mM in modif. Krebslösg. pH 8,0)	7,5 ml
	Modifizierte Krebslösung bestehend aus	
	NaCl	0,21 M - 1000 ml
	KCl	0,21 M - 40 ml
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,21 M - 10 ml
	Phosphatpuffer	0,12 M - 360 ml
3.	Nicotinamid (40mM in dest. H_2O)	1,0 ml
4.	Neotetrazoliumchlorid (6mg/ml in dest. H_2O)	1,0 ml

In einer zweiten Versuchsreihe wurden zur Bestimmung der Lokalisation des Fermentes 25 Eierstöcke untersucht.

Je zwei aufeinanderfolgende Schnitte wurden getrennt weiterbehandelt, d.h. ein Schnitt wurde der Fermentbestimmungsmethode, der andere der Haematoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Von beiden Präparaten wurden dann Diapositive angefertigt und aufeinander projiziert.

Der Gehalt der einzelnen Schnittpreparate an Enzym bzw. an Enzymaktivität wurde indirekt durch die in den Zellen niedergeschlagene Formazanmenge bestimmt.

Bei jedem Gewebeschnitt wurde mikroskopisch mit Hilfe der Einteilung im Integrationsokular (Fa. Zeiss) die gleiche Anzahl von Sichtfeldern ausgezählt (20 Felder bei 80facher Vergrößerung). Kleine und unregelmäßige Farbpartikel mußten dabei subjektiv zu einzelnen gleichgroßen, der Durchschnittsgröße entsprechenden, Formazaneinheiten (FE) zusammengefasst werden. Bei allen sechs Schnitten eines Ovars wurde die Anzahl dieser Einheiten dann addiert und das arithmetische Mittel genommen. Die so erhaltene Punktzahl wird als Aktivitätswert der 3β -ol-Steroid-Dehydrogenase angenommen.

Zur Kontrolle, ob die Werte, die aus einem Block gewonnen wurden, für das ganze Ovar repräsentativ gelten können, wurden 3-6 Blöcke in verschiedenen Ebenen eines Eierstocks entnommen und ausgewertet. Größere Unterschiede in der Fermentaktivität konnten dabei nicht gefunden werden.

IV. ERGEBNISSE

Von 200 nicht trächtigen Rindern, die vor der Schlachtung Brunsterscheinungen zeigten, wurde 1-2 Minuten nach der Tötung jeweils der Eierstock, der einen Graaf'schen Follikel trug, gewonnen. Die Ergebnisse der Fermentbestimmung dieser Ovarien werden im Folgenden als Normalgruppe angeführt. In einer zweiten Gruppe sind die Befunde von 100 Ovarien von weiteren 100 Rindern zusammengefaßt, die makroskopisch diagnostizierbare Follikelzysten von über 3 cm Durchmesser aufwiesen.

Bestimmung der Lokalisation des Fermentes

Um festzustellen in welchen Zellstrukturen die histochemischen Enzymreaktionen stattgefunden haben, wurden zwei aufeinanderfolgende Schnitte, von denen einer mittels der HE-Färbung, der andere mittels der Enzymreaktion gefärbt worden waren, miteinander verglichen. Der Vergleich erfolgte an Hand von Mikrophotographien (Vergr. 80x). Durch Übereinanderprojizieren dieser zwei getrennt behandelten Schnitte konnte die Zellart, in der das Formazan angereichert war, bestimmt werden. Obwohl die Morphologie des Gewebes und die Enzymaktivität dabei meistens gut erhalten sind, ergibt sich doch manchmal eine recht unsichere Lokalisation des Fermentes. Die Ursache liegt in dem Kompromiß zwischen histologischer Präparation und biochemischer Reaktion in der Zelle.

Der Formazanniederschlag war entweder in Form unregelmäßiger Punkte im Gewebe, oder aber in runden oder linienförmigen Anhäufungen über den gesamten Schnitt verteilt. Besonders intensiv ist das Formazan in und um ältere Gelbkörper zu beobachten, während in frischen Corpora lutea die Eigenfarbe des Gewebes eine Bestimmung der Enzymreaktion erschwert. In der Granulosazellschicht der Follikel konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Auch die Theka interna zeigte keinen Formazanniederschlag. Erst in der bereits aufgelockerten Zellschicht der Theka externa und besonders im anschließenden Interstitium sind stärkere Anhäufungen von Formazan zu beobachten. Auffallend ist, daß besonders im perivaskulären Bindegewebe, sowie auch in den Luteinzeilen, die Enzymaktivität sehr hoch ist. Im Stroma des Eierstocks konnte hingegen in keinem Falle ein Formazanniederschlag gefunden werden. Die Verteilung der Formazanniederschläge in den Ovarien mit Graaf'schen Follikeln unterscheidet sich nicht von der in Ovarien mit Zysten. Da in den Zysten zunächst die Granulosazellschicht degeneriert, in der auch bei normalem Follikel keine Enzymaktivität nachweisbar ist, erscheint dieser Befund nicht überraschend.

Bestimmung der Formazanwerte in Ovarien mit Graaf'schen Follikeln (Normalgruppe)

Nach den beschriebenen Auswertungsverfahren bewegten sich die Werte der Formazaneinheiten in den normalen Ovarien zwischen 0 und 300 FE.

Dabei lag die größte Häufigkeit bei den Werten zwischen 0 und 50 (Abb. III).

Um einen repräsentativen Querschnitt des Enzymvorkommens innerhalb eines Ovars feststellen zu können, wurden pro Eierstock mindestens 6 Schnitte ausgewertet. Extremwerte innerhalb eines Organes waren dabei sehr selten, meist lagen die Ergebnisse sehr dicht beieinander.

Bei 115 der 200 untersuchten Eierstöcke ergab die Auszählung der Sichtfelder Werte bis zu 50 FE. Weitere 33 lagen im Bereich zwischen 50 und 100, 26 bis zu 150 Formazaneinheiten. Die restlichen 26 verteilten sich in dem Bereich zwischen 150 und 300 FE.

Bestimmung der FE-Werte in Ovarien mit Follikelzysten.

Die 100 untersuchten Ovarien mit Follikelzysten wiesen sehr ähnliche Ergebnisse auf. Über die Hälfte bewegten sich im Bereich zwischen 0 und 50 (68 Ovarien), 15 erreichten 100 FE. Bei 9 Eierstöcken schwankten die Einheiten zwischen 100 und 150, während nur 8 Ovarien bis zu 300 FE aufweisen konnten (Abb. III).

FE	Normale Ovarien	Zystovarien
300	2,5 %	2 %
250	3,0 %	2 %
200	7,5 %	4 %
150	13,0 %	9 %
100	16,5 %	15 %
50	57,5 %	68 %

Abb. III: Prozentuale Verteilung der Formazaneinheiten (FE) bei 200 normalen und 100 Zystovarien.

V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Wie die Ergebnisse der Untersuchungen zur Lokalisation zeigen, scheint das Vorkommen der 3β -ol-Steroid-Dehydrogenase beim Rind wie bei allen bisher untersuchten Säugetieren an die gleichen Zellformationen gebunden zu sein. Es fallen keine extremen Abweichungen auf, obwohl sicher einzelne artspezifische Eigenheiten vorliegen, wie zum Beispiel die Verteilung des Formazanmusters im Gewebe. Wahrscheinlich ist dies abhängig von der anatomischen Anordnung der einzelnen Zellelemente in den Ovarien der verschiedenen Tierarten.

SHORT konnte z. B. bei der Untersuchung der Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit von Pferd und Rind gewisse Unterschiede feststellen, sodaß man dadurch auf eine Abweichung in der Steroid- bzw. Enzymsynthese auf Grund des anatomischen Baus schliessen könnte.

Bei den Nagern ist der Formazanniederschlag mehr oder weniger gleichmäßig über den ganzen Ovarschnitt verteilt, während beim Rind die unregelmäßige Anordnung dominiert.

Über die Ursache der zystösen Entartung der Eierstöcke bestehen sehr unterschiedliche Ansichten. Wahrscheinlich kommt ein ganzer Ursachenkomplex, sowohl exogen als auch endogen bedingt, in Frage, der sich aus Umwelteinflüssen, erblicher Disposition, sowie neurohormonalen Einflüssen zusammensetzt. Man sieht in den Zysten persistierende, nicht gesprungene, reife Follikel, die sich von normalen reifen Follikeln aber durch ihre Größe und den histologischen Aufbau unterscheiden. Heute ist man der Auffassung, daß die Zysten auf Grund zentraler Fehlsteuerungen in den übergeordneten Systemen wie Hypophyse und Pypothalamus entstehen. Ein Follikel kann dann zur Zyste werden, wenn die Ovulation ausbleibt. Damit wäre die Ursache der Zystenbildung ein Fehlen derjenigen Faktoren, die die Ovulation auslösen. RIECK, GÜNZLER und GARM meinen, ein Mißverhältnis der Gonadotropine LH und FSH die Ovulation verhindert.

Seit man weiß, daß bestimmte Enzyme die Steroidbiosynthese steuern, wird aber auch die Hypothese eines Enzymdefektes als Ursache der Zystengenes in Betracht gezogen.

SHORT hat die Steroidkonzentration in normaler Follikelflüssigkeit und in Ovarialzystenflüssigkeit von Kühen untersucht. Viele der untersuchten Zysten enthielten dabei große Mengen von Progesteron aber wenig oder gar kein 17α -Hydroxyprogesteron oder Androstendion bzw. Oestrogene.

Auffallend ist die Beobachtung, daß beim polyzystischen Ovar des Menschen (STEIN - LEVENTHAL - SYNDROM) typische Organveränderungen immer wieder gefunden werden: Stromatosis, Hyperthekosis und fibroblastische Verdickung der

Tunica albuginea. Diese morphologischen Veränderungen lassen vermuten, daß die Oestrogensynthese gestört ist und zwar im Sinne einer vermehrten Androgensynthese. So konnten SANDOR & LANTHIER sowie AXELROD & GOLDZIEHER und ZANDER in polyzystischen Ovarien des Menschen eine verstärkte Bildung von Androgenen (Androstendion, Testosteron, Dehydroepiandrosteron) feststellen. Sie kamen dadurch zu der Annahme, daß im polyzystischen Ovar des Menschen verschiedene Enzymsysteme teilweise oder völlig blockiert sind. Eine Aktivitätsmin- derung der 3β - 01 -Dehydrogenase würde die Oestrogensynthese in einer bestimmten Richtung beeinflussen.

MAHESH & GREENBLATT sowie ZANDER & WIEST wiesen an Eierstöcken am Stein- Leventhal-Syndrom erkrankter Patientinnen durch Bebrütung mit verschiedenen Steroidvorläufern einen Mangel des Enzymes 3β - 01 -DH nach. Beim Rind sind derartige Untersuchungen bisher nicht durchgeführt worden, sodaß in der Ätiologie der Zystenbildung bisher auch kein Enzymdefekt diskutiert wird.

Durch einen Vergleich der Ergebnisse der untersuchten normalen und zystös entar- teten Ovarien konnte ein grundlegender Unterschied der 3β - 01 -Dehydrogenaseak- tivität in quantitativer Hinsicht nicht nachgewiesen werden.

Die Werte schwankten in beiden Versuchsgruppen zwischen 0 und 300 FE, wobei die Häufigkeitsverteilung innerhalb der Untergruppen (FE - Werte) gleichfalls kei- ne Unterschiede größeren Ausmaßes aufwies.

Eine Erklärung für die relativ große Streuung der FE-Werte ist nicht möglich. Es besteht aber die Möglichkeit, daß rasche Schwankungen der Enzymaktivität wäh- rend des Oestrus bzw. der Zystenbildung Ursache der Beobachtung sind. Eventuell hängt sie auch mit dem Zykluszustand des Ovars bei der Organentnahme zusam- men. ERNST weist z. B. auf das häufige Umrindern von Schlachttieren durch sogeannte parazyklische Ovulationen hin, die auf Grund nervös-psychischer Reize bei Transport, Zusammentreffen vieler Tiere u. ä. entstehen.

Auffallend bei beiden Gruppen war die prozentuale Verteilung der FE-Werte. Bei den Zystovarien zeigten 10 % keine Formazanniederschläge (0 FE), während bei den normalen Eierstöcken nur 5 % keinerlei Enzymaktivität erkennen ließen.

Im Bereich von 1 bis 50 FE bewegten sich bei den Zysten 68 %, bei den gesunden Ovarien jedoch nur 57,5 %. Bei den höheren FE-Werten findet eine Angleichung statt. 16 % der Normalgruppe enthalten bis zu 100 FE und 13 % bis 150 Formazan- einheiten. Nur 2,5 % dieser Gruppe wiesen Werte bis zu 300 FE auf.

Bei den zystös degenerierten Ovarien sind 15 % in der Gruppe bis zu 100 FE, 9 % bis 150 FE und nur 2 % bis 300 FE (Abb. III).

Die graphische Darstellung der Untersuchungsergebnisse läßt erkennen, daß die Häufigkeitsverteilung der FE-Werte bei den Zystovarien etwas steiler abfällt als bei den normalen Ovarien (Abb. IV). Dieser Unterschied ist aber statistisch nicht signifikant.

Somit liegt also kein Grund vor zu der Annahme, daß die Ursache der Zystenbildung in einem Mangel an 3β -01-Steroid-Dehydrogenase liegt. Die Tatsache, daß zur Bildung der 3β -01-DH das Luteinisierungshormon des Hypophysenvorderlappens (LH) notwendig ist, führt zu der Annahme, daß die geringen Unterschiede zwischen normalen und zystös entarteten Ovarien Folge einer verminderten LH-Wirkung sein können.

Allen Anschein nach ist also bei der Zystenbildung am Ovar des Rindes ein Enzymdefekt nicht beteiligt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden 200 normale Ovarien von Rindern mit Graaf'schen Follikeln und 100 Ovarien mit Follikelzysten auf das Vorkommen der 3β - α 1-Steroid-Dehydrogenase untersucht.

Die Lokalisation des Fermentes im Ovar des Rindes entspricht mit geringen Abweichungen der bei Nagern und beim Menschen.

Hauptorte des Enzymvorkommens sind die interstitiellen Zellen, die Theka externa und der Gelbkörper.

Ein quantitativer Unterschied der 3β - α 1-Dehydrogenaseaktivität gesunder und zystös entarteter Ovarien konnte nicht festgestellt werden.

ABB. IV.

VORKOMMEN DER
3 β -OL-STEROID-DEHYDROGENASE
IN NORMALEN UND ZYSTÖS ENTARTETEN
RINDEROVARIEN

FORMAZIN
EINHEITEN

FE

450

200

100

50

0

NORMALE OVARIEN

ZYSTOVARIIEN

% DER UNTERSUCHTEN
OVARIEN

0

10

20

30

40

50

60

70

80

90

100

11. Diczfalusy E. u.
Lauritzen Chr. (1961): Oestrogene beim Menschen
Springerverl. Berlin-Göttingen Heidelberg
12. Dorfman R. J. (1956): Metabolism of androgens, estrogens and
corticoids
Americ. J. of Med. 21, 679
13. Eckstein P. (1962): Ovarian physiology in the non pregnant
female
The Ovary by Sir S. Zuckerman
VolII, 3II Acad. Press
14. Ernst K. (1956): Morphologische und funktionelle Untersu-
chungen am Rinderovar
Med. vet. Diss. München
15. Fuhrmann K. (1961): Verhalten der 3 β -ol, 11 β -ol, 17 β -ol-Ste-
roid-Dehydrogenase im Ovar nach Gonadotro-
pinbehandlung u. Hypophysektomie
III. Weltkongr. Intern. Federation f. Gynaek.
u. Geburtshilfe Wien III
16. Garm O. (1949): A study of bovine nymphomania Acta endo-
crin. Suppl. 3 III
17. Günzler O. (1962): Zur Pathogenese und Therapie der Ovarial-
zyste des Rindes TU, 62, 378
18. Hanc O. (1959): Hormone
G. Fischer Verlag Jena
19. Heard R. D. H.,
Jellinck W. u.
o' Donnell (1955): Biogenesis of the estrogens Endocrin.
57, 200
20. Hilliard J. D.,
Archibald D. u.
Sawyer C. H. (1963): Gonadotropic activation of prevulatory synthe-
sis and release of progestin in the rabbit
Endocrin. 72, 59
21. Ikonen M., Niemi M.,
Pesonen S. und
Timonen S. (1961): Histochemical localisation of 4 Dehydroge-
nase systems in human ovary during the men-
strual cycle
Acta endocrin. Cbh. 38, 293

22. Jensen E. (1963): Über die Wirkungsweise von Oestrogenen
Dt. med. Wschr. 88, 1229
23. Jung A. u.
König P. A. (1965): Enzyme des Ovariums
S. Karger Basel - New York
24. Klebs E. (1868): Oxydationsvorgänge und Wärmebildung im
Tierkörper
Zbl. med. Wiss. 6, 478
25. Levy H., Deane H. W.
Rubin B. L. (1959): Vizualisation of steroid-3 β -ol-DH-ectivity
in tissues of intact and hypophysectomized
rats
Endocrin. 65, 932
26. Little und Shaw (1961): Umwandlung von Progesteron in 17 α -Hydroc-
xyprogesteron durch die menschliche Placenta
in vitro
Acta endocrin. CBH. 36, 455
27. Mahesh V. B. u.
Greenblatt R. B. (1961): Physiology and pathogenesis of the Stein-
Leventhal-Syndrome
Nature 191, 888
28. Marcus Ph. u. Talalay P.
(1956): Induction and purification of α + β Hydroxy-
steroiddehydrogenase
J. of biol. chem. 218, 112
29. McKay G. D. u.
Robinson D. (1947): Observations on the fluorescence birefringence
and histochemistry on the human ovary during
the cycle
Endocrin. 41, 378
30. Meyer R. K. u.
McShan W. H. (1950): Hormon-Enzymwechselbeziehungen
Rec. progr. horm. res. 5, 271
31. Rieck G. W. (1958): Die Nymphomanie des Rindes
DTW 65, 275 u. 331
32. Ryan K. J. (1964): Proceedings of the second int. Congr. of Endo-
crin.
Int. Congr. series N^o 83
Excerpta medica Foundation Amst. NY. Lon-
don, Milan, Tokyo, Buenos Aires, Part. II, 727

33. Samuels L. T. (1951): Ref. in Science 113, 183
34. Samuels L. T. u.
Helmreich M. L. (1956): The influence of the chronic gonadotropin in the 3β -ol-DH-activity of testes and adrenal Endocrin. 58, 435
35. Sandor Th. u.
Lanthier A. (1962): The in vitro hiosynthesis of androgenic steroids by human normal and Stein-Leventhal-Type ovarian slices
Acta endocrin. Cbh. 39, 145
36. Short R. V. (1962): Steroids in the follicular fluid and the corpus luteum of the mare. A two-cell-type-theory
J. endocrin. 24, 59
37. Short R. V. (1961): Δ^5 - 3β -hydroxysteroids in the follicular fluid of the mare
J. endocrin. 23, 277
38. Short R. V. (1962): Steroid concentrations in normal follicular fluid and ovarian cyst fluid from cows
J. reprod. fertil. 4, 27
39. Short R. V. (1962): Steroids present in the follicular fluid of the cow
J. endocrin. 23, 401
40. Spannhof L. (1964): Einführung in die Praxis der Histochemie
G. Fischer Verlag Jena
41. Taylor F. B. (1961): Histochemical changes in the ovaries of the normal and experimentally treated rats
Acta endocrin. Cbh. 36, 361
42. Wattenberg L. W.
(1958): Microscopic histochemical demonstrations of the steroid- 3β -ol-DH in tissue sections
J. of histochem. cytochem. 6, 225
43. Zander J., Wiest G. W.
Ober K. G. (1962): Klinisch, histologisch, biochemische Beobachtungen bei polycystischen Ovarien.
Umwandlung von Progesteron 4-C-14 im Ovarialgewebe.
Archiv f. Gynaek. 196, 481

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. W. Baier möchte ich zum Schluß für die Überlassung des Themas und seine jederzeit wohlwollende Unterstützung recht herzlich danken. Ebenso bin ich Herrn Univ. Doz. Dr. M. Rüsse und den Herren des histologischen Instituts der Fakultät für ihre tatkräftige Hilfe zu Dank verpflichtet.

L e b e n s l a u f

Am 23. Juni 1940 wurde ich, Ursula Meixner, geb. van de Witt, als älteste Tochter des Facharztes Dr. W. van de Witt und seiner Ehefrau Lieslotte in Nürnberg geboren. Von 1946 bis 1950 besuchte ich dort die Volksschule und im Anschluß daran bis 1959 das städtische Mädchenrealgymnasium Labenwolf und legte dort die Reifeprüfung ab.

Vom Wintersemester 1959 bis 1964 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Tiermedizin und bestand am 23. Juli 1964 das tierärztliche Staatsexamen. Meine Approbation erhielt ich am 1. Mai 1965.

